

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
6. Dezember 2001 (06.12.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/92477 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 5/06, (74) Anwälte: SCHRELL, Andreas usw.; Maybachstrasse 5/08, G01N 33/50 6A, 70469 Stuttgart (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/06074 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum: 29. Mai 2001 (29.05.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
100 26 789.0 31. Mai 2000 (31.05.2000) DE  
100 62 623.8 15. Dezember 2000 (15.12.2000) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54, 80636 München (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): NOLL, Michaela [DE/DE]; Abraham-Wolf-Strasse 44, 70597 Stuttgart (DE). GRAEVE, Thomas [DE/DE]; Nauheimerstrasse 17, 70372 Stuttgart (DE).
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:  
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: THREE-DIMENSIONAL SKIN MODEL

(54) Bezeichnung: DREIDIMENSIONALES HAUTMODELL

(57) Abstract: The invention relates to methods for cultivating dermal fibroblasts, methods for producing *in vitro* dermis equivalents, methods for producing three-dimensional *in vitro* skin equivalents, an *in vitro* dermis equivalent, a three-dimensional *in vitro* skin equivalent and methods for determining the effect of a chemical substances or an agent on human skin cells using the *in vitro* dermis equivalent and/or the *in vitro* skin equivalent.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Kultivierung dermaler Fibroblasten, Verfahren zur Herstellung von *in vitro*-Dermisäquivalenten, Verfahren zur Herstellung von dreidimensionalen *in vitro*-Hautäquivalenten, ein *in vitro*-Dermisäquivalent, ein dreidimensionales *in vitro*-Hautäquivalent und Verfahren zur Bestimmung der Wirkung einer chemischen Substanz oder eines Agens auf menschliche Hautzellen unter Verwendung des *in vitro*-Dermisäquivalents und/oder des *in vitro*-Hautäquivalents.

WO 01/92477 A2

## Dreidimensionales Hautmodell

### Beschreibung

- 5 Die Erfindung betrifft ein hauttypisches, dreidimensionales, vorzugsweise humanes, in vitro-Hautäquivalent, bestehend aus einem Dermisäquivalent und einem Epidermisäquivalent, und Verfahren zur Herstellung, Kultivierung und Anwendung dieses
- 10 Hautäquivalents sowie dessen Bestandteile.

Hauttypische Vollhautmodelle, die auch als in vitro-Hautäquivalente bezeichnet werden, können insbesondere in der Dermatologie und in der Allergologie als Testhaut verwendet werden, um Substanzen, beispielsweise potentielle Arzneimittel oder Kosmetika, oder Agenzien, wie Licht und Wärme, auf ihre pharmakologischen Wirkungen, insbesondere Reiz-, Toxizitäts- und Entzündungswirkungen, und auf ihre Verträglichkeit zu untersuchen. Ein solches System kann darüber hinaus für vielfältige immunologische, histologische und molekularbiologische Fragestellungen eingesetzt werden. Dazu zählen zum Beispiel Studien zur Wundheilung und zur Penetration und Resorption von Substanzen. Die Untersuchungen beziehungsweise Tests von Substanzen an solchen Vollhautmodellen bieten gegenüber Tierversuchen und Versuchen mit menschlichen Probanden wesentliche Vorteile, da die damit erzielten Ergebnisse reproduzierbarer sind und die Untersuchungen kostengünstiger und schneller durchgeführt werden können.

15

20

25

30

-2-

Zur Prüfung von Rohstoffen und Produkten sind in den letzten Jahren zumeist humane Zellkulturen als in vitro-Systeme verwendet wurden. Eine Weiterentwicklung der Zellkulturtechnik stellen dreidimensionale, organähnliche, humane Zellstrukturen und Co-kultursysteme dar. Die damit gewonnenen Ergebnisse lassen sich noch besser auf den Menschen übertragen als die an Einzelzellkulturen gewonnenen Ergebnisse. Mit den Entwicklungen von Rheinwald und Green (Rheinwald, J. G. et al., "Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: The formation of keratinizing colonies from single cells", Cell, 6 (1975), 331-344; Green, H. et al., "Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting", Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76 (1979), 5665-5668) hat die Kultivierung von humanen Keratinocyten und deren Anwendung in der Verbrennungsmedizin und der in vitro-Dermatologie ihre Anfänge genommen. Bislang wurden unterschiedliche Modelle rekonstruierter Haut in vitro hergestellt.

Die EP 0 197 090 B1 offenbart ein Verfahren zur Bildung eines Hautäquivalents, wobei durch Mischen einer sauren Kollagenlösung mit kontraktile Zellen, beispielsweise Fibroblasten, ein hydratisiertes Kollagengitter hergestellt wird. Nach Neutralisierung des pH-Wertes werden in dem Kollagengitter Kollagenfibrillen ausgefällt. Die kontraktile Zellen lagern sich an das Kollagengitter an und bewirken dessen Kontraktion, wobei sich ein Dermisäquivalent bildet. Durch das Einbringen von Hautstanzbiopsien in das Kollagengitter können Keratinocyten aus den Stanzbiopsien auf der Oberfläche

-3-

des Dermisäquivalentes wachsen, wobei sich ein Hautäquivalent bildet.

5 In der EP 0 285 474 B1 wird ein Hautäquivalent offenbart, das ein aus Kollagen und Fibroblasten erhaltenes Dermisäquivalent und ein mehrschichtiges Epidermisäquivalent umfaßt. Dabei wird das Dermisäquivalent mit einem menschlichen oder tierischen Explantat, beispielsweise einem Haarfollikel, beimpft, um das Epidermisäquivalent zu erhalten.

10 Die EP 0 020 753 B1 beschreibt ein Verfahren zur Bildung von Gewebe, insbesondere Hautgewebe, wobei ebenfalls Fibroblasten in ein hydratisiertes Kollagengitter eingebracht werden und sich nach Kontraktion des Kollagengitters ein Gewebe bildet. Auf  
15 dieses Gewebe können zuvor in vitro kultivierte Keratinocyten oder aus Vorhaut isolierte Keratinocyten aufgebracht werden, wobei sich ein Hautersatz bildet.

Aus der EP 0 418 035 B1 ist ein Gewebeäquivalent  
20 bekannt, das ein hydratisiertes Kollagengitter, welches mittels eines kontraktilen Agens wie Fibroblasten kontrahiert wird, und ein Kollagengel, welches mit einem permeablen Element in Kontakt steht, umfaßt. Dabei wird das Gemisch aus Kollagen  
25 und kontraktilen Agens auf das Kollagengel aufgetragen, wobei durch den Kontakt zwischen Kollagengel und permeablem Element, beispielsweise einer Polycarbonatmembran, die radiale oder laterale Kontraktion des Kollagengitters unterbunden wird, so  
30 dass das Gitter nur bezüglich seiner Dicke kontrahiert. Nach Bildung des Dermisäquivalents können

-4-

dann Keratinocyten ausgesät werden, wobei sich ein Hautäquivalent bildet.

Ferner offenbart das US-Patent Nr. 5,861,153 ein Hautäquivalent, das aus einem Epidermisäquivalent auf einem Träger besteht, wobei das Epidermisäquivalent Keratinocyten und induzierte oder nicht induzierte Vorläufer von Langerhans-Zellen umfasst. Bei dem Träger kann es sich um ein Fibroblasten enthaltendes Kollagengitter handeln oder um von der Epidermis befreite Dermisabschnitte, künstliche Membranen, einen Subkutanersatz auf der Basis von Kollagen oder synthetische Materialien.

Das US-Patent Nr. 4,963,489 beschreibt ein in vitro hergestelltes Stroma-Gewebe, wobei die Stromazellen, beispielsweise Fibroblasten, ein Grundgerüst umhüllen, das aus einem biologisch verträglichen Material, beispielsweise Cellulose, besteht. Das beschriebene System läßt sich unter anderem zur Herstellung eines dreidimensionalen Hautkultursystems verwenden, wobei Keratinocyten und Melanocyten auf dem Dermisäquivalent, das heisst der dreidimensionalen Stroma-Trägermatrix, ausgebracht werden.

Das US-Patent Nr. 5,755,814 beschreibt ein Hautmodellsystem, das sich sowohl als in vitro-Testsystem als auch für therapeutische Zwecke einsetzen läßt. Das System umfasst eine dreidimensionale vernetzte Matrix von unlöslichem Kollagen mit darin enthaltenen Fibroblasten und stratifizierte Schichten differenzierter Epidermiszellen, wobei eine Epidermiszell-Schicht in direktem Kontakt zu der Oberfläche der Kollagen-Matrix steht. Die Vernetzung der Mat-

rix kann sowohl mittels thermischer Behandlung unter Wasserentzug als auch durch chemische Mittel, beispielsweise Carbodiimid, erfolgen.

5 In dem US-Patent Nr. 5,882,248 ist ein Verfahren zur Bestimmung der Wirkung chemischer Substanzen oder Agenzien auf ein menschliches Hautmodellsystem gemäß US-Patent Nr. 5,755,814 beschrieben. Die Wechselwirkung zwischen dem Hautmodellsystem und den zu testenden Substanzen wird anhand der Frei-  
10 setzung von Stoffen durch Zellen des Hautmodellsystems sowie der Wirkungen auf Stoffwechsel, Proliferation, Differenzierung und Reorganisation dieser Zellen bestimmt.

15 In der WO 95/10600 ist darüber hinaus ein Verfahren beschrieben, mit dem ein Epidermisäquivalent gewonnen werden kann. Dieses Epidermisäquivalent kann für pharmazeutische und/oder kosmetische Sonnenbräunungs-Tests verwendet werden.

20 Bei den bekannten Hautmodellen wirkt sich nachteilig aus, dass diese zumeist nur aus einer oder mehreren epidermalen Schicht(en) aus Keratinocyten bestehen. In den Fällen, wo eine stratifizierte Epidermis erhalten wird, werden Gewebe-Explantate eingesetzt, die die Gefahr einer Kontamination mit Er-  
25 regern in sich bergen, was bei einer späteren Verwendung des Hautäquivalents als Testhaut zu Ergebnisverfälschungen führen kann. Sofern die beschriebenen Hautmodelle einen Dermalteil besitzen, besteht dieser häufig aus spongiösem, quervernetztem  
30 Material, das neben Kollagen außerdem noch andere nicht-hauttypische Materialien enthalten kann. So-

fern bei den im Stand der Technik beschriebenen Hautäquivalenten der Dermalteil nur aus Kollagen und Fibroblasten besteht, ist er einem undefinierten Schrumpfungsprozess unterworfen, der auf eine  
5 starke Schrumpfung des Kollagengels und einen Flüssigkeitsaustritt daraus zurückzuführen ist. Dies führt dazu, dass die im Stand der Technik beschriebenen Hautäquivalente sich nur in beschränktem Maße als Testhaut definierter Größe eignen und die damit  
10 erhaltenen Ergebnisse sich nur bedingt auf native menschliche Haut übertragen lassen.

Das der vorliegenden Erfindung zu Grunde liegende technische Problem besteht also darin, ein weitgehend nativer menschlicher Haut entsprechendes drei-  
15 dimensionales humanes in vitro-Vollhautmodell sowie Verfahren und Mittel zu dessen Herstellung bereit zu stellen, das sowohl eine Epidermisschicht als auch eine Dermissschicht besitzt, die keinem undefinierten Schrumpfungsprozess unterworfen ist, und  
20 das sich als Testhaut definierter Größe beispielsweise zur Untersuchung pharmakologischer und kosmetischer Wirkungen einsetzen lässt.

Die Erfindung löst das ihr zu Grunde liegende Problem durch die Bereitstellung eines Verfahrens zur  
25 Differenzierung und/oder Vermehrung isolierter dermaler Fibroblasten, wobei die Fibroblasten in einer dreidimensionalen gelartigen Biomatrix kultiviert werden und sich dort vermehren können. Diese Biomatrix enthält neben den zu kultivierenden  
30 Fibroblasten ein aus einer Kollagenlösung konstituiertes Gerüst aus menschlichem oder tierischen Kollagen, also gewebetypische Matrixproteine. Dieses

-7-

Kollagen-Fibroblasten-Gel wird erfindungsgemäß bevorzugt einer ein- bis zweitägigen Submers-Kultur unterworfen. Auf die Fibroblasten enthaltende Biomatrix werden danach Keratinocyten-Stammzellen ausgesät. In besonders bevorzugter Ausführungsform werden vorzugsweise Keratinocyten mit einem vergleichsweise hohen Anteil, beispielsweise 0,5%, 1%, 2%, 5%, 8%, oder 10% an der Keratinocyten-Zellpopulation, oder umfassend nur undifferenzierte Stammzellen, eingesetzt. Unter Verwendung spezifischer Kulturbedingungen, die insbesondere eine mehrtägige Submerskultur und eine nachfolgende mehrtägige Airlift-Kultur des Biomatrix-Systems umfassen, und spezifischer Kulturmedien durchlaufen die Keratinocyten eine Differenzierung zu einer mehrschichtigen Epidermisschicht. Erfindungsgemäß ist darüber hinaus in einer bevorzugten Ausführung vorgesehen, dass vor, während oder nach der Aussaat der Keratinocyten auch andere Zelltypen und/oder andere Zellen anderer Gewebetypen auf der Biomatrix ausgesät werden können, zum Beispiel Immunsystemzellen.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Verfahren wird somit ein organoides in vitro-Hautmodell erhalten, das aus zwei gewebetypischen Schichten, nämlich einem Dermisäquivalent und einem Epidermisäquivalent, aufgebaut ist. Das organotypische Hautmodell entspricht sowohl histologisch als auch funktionell weitgehend der nativen Haut.

Durch ein spezielles Verfahren zur Kollagenextraktion und durch die Zusammensetzung der zur Bildung der Biomatrix verwendeten Kollagen-Suspension wird erreicht, dass das Dermisäquivalent im Verlauf der



Kultivierungsdauer keinem undefinierten Schrump-  
fungsprozess unterworfen ist. Aufgrund der verwen-  
deten Kulturverfahren und der Verwendung von Zell-  
kulturinserts mit einer speziellen Oberflächenbe-  
schichtung wird erreicht, dass der Dermalteil le-  
5 lediglich einer definierten Schrumpfung in vertikaler  
Richtung unterworfen wird, während eine Schrumpfung  
in horizontaler Richtung verhindert wird. Dadurch  
werden Hautäquivalente mit definiertem Durchmesser,  
10 einheitlicher Oberfläche und einem definierten Ab-  
schluss zum Rand des Kulturinserts erhalten. Durch  
die einheitliche Größe und einheitliche Beschaffen-  
heit des als Testoberfläche verwendeten Vollhautmo-  
dells wird erreicht, dass bei Tests von Substanzen  
15 auf pharmakologische und/oder kosmetische Effekte  
die Qualität der Ergebnisse gesteigert und die  
Testergebnisse reproduzierbarer werden.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der Er-  
findung umfasst die Kultivierung dermalen  
20 Fibroblasten in einer dreidimensionalen gelartigen  
Biomatrix zur Vermehrung der Fibroblasten oder zur  
Herstellung eines Dermisäquivalentes und/oder eines  
Hautäquivalentes.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung be-  
deutet der Begriff "Kultivieren von Zellen" ein,  
25 vorzugsweise in vitro stattfindendes, Aufrechter-  
halten der Lebensfunktionen von Zellen, beispiels-  
weise Fibroblasten, in einer geeigneten Umgebung,  
beispielsweise unter Zu- und Abfuhr von Stoffwech-  
30 seledukten und -produkten, insbesondere auch eine  
Vermehrung der Zellen.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter dermalen Fibroblasten natürlicherweise vorkommende, insbesondere in der Dermis vorkommende Fibroblasten oder gentechnisch veränderte  
5 Fibroblasten oder deren Vorläufer verstanden. Fibroblasten stellen die Vorläufer dermalen Fibrocyten, das heisst spindelförmiger Zellen des Haut-Bindegewebes mit ovalem Kern und langen Fortsätzen, dar. Die Fibroblasten können tierischer oder  
10 menschlicher Herkunft sein.

Die zur Kultivierung der Fibroblasten vorgesehene Biomatrix enthält also die zu kultivierenden Fibroblasten und ein aus einer, vorzugsweise frischen, Kollagenlösung menschlichen oder tierischen  
15 Ursprungs neu konstituiertes Kollagengerüst einer Konzentration von mindestens 3 mg Kollagen pro ml Biomatrix, vorzugsweise 3,5 bis 4,5 mg Kollagen pro ml Biomatrix. Das Kollagengerüst wird aus einer, vorzugsweise zellfreien, sauren Lösung von Kollagen  
20 I, gewonnen, wobei die Proteinkonzentration der Kollagenlösung vorzugsweise 5 bis 7 mg/ml beträgt. Der pH-Wert der Kollagenlösung beträgt 0,1 bis 6,9, vorzugsweise 2,0 bis 5,0, bevorzugt 3,0 bis 4,5, insbesondere 3,2 bis 4,2 und besonders bevorzugt  
25 3,8. Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Fibroblasten-haltigen Biomatrix wird die Kollagenlösung bei 2°C bis 10°C, vorzugsweise bei 4°C, mit einer Lösung, enthaltend ein, vorzugsweise fünffach konzentriertes, Zellkulturmedium, vorzugsweise  
30 fünffach konzentriertes M199-Zellkulturmedium, Puffer, vorzugsweise Hepes-Puffer, Serum, vorzugsweise fötales Kälberserum (FCS), und Chondroitin-(4/6)-sulfat, und vorzugsweise  $1,5 \times 10^5$ /ml Fibroblasten,

insbesondere vorkultivierten Fibroblasten, versetzt und gut gemischt. Dieses Gemisch wird in die Vertiefungen einer Mikrokulturplatte mit 24 Vertiefungen, wobei jede Vertiefung einen Durchmesser von 10 mm aufweist, gegeben und durch Erhöhung der Temperatur auf beispielsweise Raumtemperatur oder 37° erfolgt eine Gelierung. Nach dem Gelieren der Fibroblasten-Kollagengele wird Fibronectin, vorzugsweise humanes Fibronectin, auf die Gele gegeben. Bei Fibronectinen handelt es sich um in Fibroblasten produzierte Struktur- beziehungsweise Adhäsionsproteine, deren Funktion in vivo in der Bindung an andere Makromoleküle, beispielsweise Kollagen, und in der Anheftung von Zellen an Nachbarzellen besteht. Durch die Zugabe von Fibronectinen zur Fibroblasten-Kollagenmatrix wird also die Bindung der Fibroblasten sowohl an Kollagen als auch untereinander begünstigt. Die anschließende Kultivierung der Fibroblasten im Kollagengel erfolgt vorzugsweise in Submers-Kultur. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer „Submers-Kultivierung“ oder einer „Submers-Kultur“ ein Verfahren zur Kultivierung von Zellen verstanden, wobei die Zellen mit einer Nährlösung bedeckt sind. Die Fibroblasten enthaltende Biomatrix wird also mit Zellkulturmedium überschichtet und bei 37°C inkubiert.

In einer vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung können die in der Biomatrix kultivierten Fibroblasten wieder aus der Biomatrix herausgelöst und gegebenenfalls erneut in eine Biomatrix eingebracht werden, wobei die Zellen nach Herauslösen ihre spezifischen Stoffwechselleistungen und ihren

- Differenzierungsstatus nicht verlieren. Das erfindungsgemäße Verfahren gestattet es also, eine Zwischenkultivierung der Fibroblasten in der Biomatrix durchzuführen. Bei einer geringen Ausgangsmenge an
- 5 Fibroblasten bietet das erfindungsgemäße Verfahren daher den Vorteil, dass genügend Zellmaterial für die Herstellung von Dermisäquivalenten und/oder Hautäquivalenten zur Verfügung gestellt werden kann.
- 10 Eine weitere vorteilhafte Ausgestaltung der Erfindung sieht vor, dass dermale Fibroblasten, die in ihrer Funktion, ihrer Morphologie und/oder ihrem Differenzierungsstatus überprüft werden sollen, in eine vorstehend genannte dreidimensionale Biomatrix
- 15 eingebracht, kultiviert und dabei und/oder danach überprüft werden. Die Erfindung betrifft daher auch unter Verwendung dermalen Fibroblasten durchgeführte Screening- und Diagnoseverfahren, wobei die Fibroblasten gemäß dem vorstehend beschriebenen
- 20 Verfahren kultiviert und dabei und/oder anschließend untersucht werden können, zum Beispiel auf pharmakologische, toxikologische, physiologische, morphologische und/oder molekularbiologische Parameter.
- 25 In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung werden die dermalen Fibroblasten in der dreidimensionalen Biomatrix, wie vorstehend beschrieben, so kultiviert, dass anschließend ein Dermisäquivalent gewonnen werden kann. Im Zusammen-
- 30 hang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem „Dermisäquivalent“ eine Bindegewebe-artige

- 12 -

Schicht aus Kollagen und Fibroblasten verstanden, die weitgehend der nativen Dermis entspricht.

Das so erhaltene Dermisäquivalent kann für Screening- und Diagnoseverfahren verwendet werden, insbesondere zur Untersuchung der Wirkungen chemischer Substanzen, beispielsweise potentieller Arzneimittel oder Bestandteile von Kosmetika, oder anderer Agenzien. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter dem Begriff „Agens“ oder „Agenzien“ insbesondere auf die Haut oder Hautzellen wirkende physikalische Mittel wie Licht, Wärme, oder ähnliches, verstanden. Die Erfindung betrifft daher auch Screening- und Diagnoseverfahren unter Verwendung der erfindungsgemäß hergestellten Dermisäquivalente.

Eine bevorzugte Ausführung der Erfindung umfasst die Behandlung des Dermisäquivalents in An- und Abwesenheit der zu untersuchenden Substanz und/oder des zu untersuchenden Agens und den Vergleich der beobachteten Auswirkungen auf die Zellen oder Zellbestandteile des Dermisäquivalents.

Eine weitere bevorzugte Ausführung der Erfindung umfasst ein Verfahren zur Untersuchung der Penetration von Substanzen unter Verwendung des erfindungsgemäß hergestellten Dermisäquivalents und unter Verwendung eines erfindungsgemäßen Hautäquivalents, das aus einem Dermisäquivalent und einem Epidermisäquivalent besteht.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft auch ein vorgenanntes Verfahren

zur Kultivierung dermalen Fibroblasten in einer Biomatrix zur Herstellung eines aus Dermisäquivalent und Epidermisäquivalent bestehenden Hautäquivalentes. Dabei werden ein bis drei Tage, vorzugsweise zwei Tage, nach der vorstehend beschriebenen Herstellung und Inkubation der Kollagen-Fibroblasten-Gele Keratinocyten auf das Gel ausgesät.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter „Keratinocyten“ Zellen der Epidermis, die verhornendes Plattenepithel bilden, oder gentechnisch veränderte Keratinocyten oder deren Vorläufer verstanden, die tierischer oder menschlicher Herkunft sein können. Da die Ausbildung einer gut differenzierten Epidermis mit intakter Verhornung in starkem Maße vom Anteil basaler Stammzellen in den verwendeten Keratinocyten abhängt, handelt es sich bei den auf das Kollagengel ausgesäten Keratinocyten vorzugsweise um möglichst undifferenzierte Keratinocyten-Stammzellen aus humanem Biopsiegewebe, das heisst Cytokeratin 19- beziehungsweise Integrin  $\beta$ 1-positive basale Stammzellen. Vorzugsweise handelt es sich dabei um vorkultivierte Zellen, besonders bevorzugt um Keratinocyten in der ersten oder in der zweiten Zellpassage. Die Aussaat der Keratinocyten auf die Biomatrix erfolgt vorzugsweise in einem Zellkulturmedium, besonders bevorzugt in KBM-Medium (Clonetics), das 5% fötales Kälberserum enthält. Anschließend wird die Biomatrix mit KBM-Medium, enthaltend humanen epidermalen Wachstumsfaktor (hEGF) (0,1  $\mu$ g/500 ml Medium), BPE (15 mg/500 ml Medium) und 0,8 mM  $\text{CaCl}_2$ , überschichtet und einer vorzugsweise 1 - bis 3-tägigen Submers-

- 14 -

Kultivierung unterworfen. Eine vollständige Differenzierung der Keratinocytschichten wird durch eine Airlift-Kultur mit 1,8 mM  $\text{CaCl}_2$  enthaltendem KBM-Medium ohne hEGF und BPE erreicht. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer „Airlift-Kultur“ eine Kultur verstanden, wobei die Höhe des Nährmedienspiegels genau auf die Höhe der Biomatrix abgestimmt ist, während die Keratino-  
cyten oder durch die Keratinocyten gebildeten Zell-  
schichten über dem Nährmedienspiegel liegen und vom Nährmedium nicht bedeckt werden, das heisst die Kultivierung erfolgt an der Grenzschicht Luft-Nährmedium, wobei die Versorgung der Kulturen von unten her erfolgt. Dazu werden die Inserts aus der Mikrotiterplatte mit 24 Vertiefungen in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit 6 Vertiefungen mit jeweils einem Durchmesser von 3,5 cm übertragen. Nach einer, vorzugsweise 12- bis 14-tägigen Airlift-Kultur entwickelt sich ein hauttypisches, aus Dermisäquivalent und Epidermisäquivalent bestehendes in vitro-Vollhautmodell.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung eines in vitro-Vollhautmodells kann vorteilhafterweise so modifiziert werden, dass vor, während oder nach der Aussaat von Keratinocyten weitere Hautzelltypen, wie Melanocyten, Immunzellen und/oder Endothelzellen, auf der Biomatrix ausgesät und weiter kultiviert werden können.

Die Erfindung betrifft daher auch ein hauttypisches in vitro-Vollhautmodell, insbesondere ein humanes in vitro-Vollhautmodell, das nach dem erfindungsgemäßen Verfahren und einem gegebenenfalls anschlie-

Benden und/oder vorausgehenden Kultivierungsverfahren herkömmlicher Art hergestellt wurde und das mindestens 2 bis 4 proliferative, einige differenzierende und mindestens 4 bis 5 verhornte Zellschichten umfasst, wobei das Epidermisäquivalent Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum umfasst und wobei zwischen dem Dermisäquivalent und dem Epidermisäquivalent eine funktionsfähige Basalmembran aus Matrixproteinen enthalten ist und wobei darüber hinaus hauttypische Proteine wie Fillgrin, Ki-67 und Cytokeratin 10 exprimiert werden.

Aufgrund der Komplexität des hergestellten Hautmodells kann dieses gezielt für verschiedene Fragestellungen der chemisch-pharmazeutischen Industrie und der kosmetischen Industrie verwendet werden. Insbesondere eignet sich das erfindungsgemäß hergestellte Hautäquivalent zur Produktprüfung, beispielsweise im Hinblick auf Wirksamkeit, unerwünschte Nebenwirkungen, beispielsweise Reiz-, Toxizitäts- und Entzündungswirkungen oder allergieauslösende Wirkungen, oder Verträglichkeit von Substanzen. Dabei kann es sich um Substanzen handeln, die potentielle Verwendung als Arzneimittel, insbesondere als Dermatika, finden sollen, oder um Substanzen, die Bestandteil von Kosmetika sind. Das erfindungsgemäß hergestellte Hautäquivalent kann beispielsweise auch für Studien zur Resorption, zum Transport und/oder zur Penetration von Substanzen verwendet werden. Darüber hinaus eignet es sich auch zur Untersuchung anderer Agenzien, wie Licht oder Wärme, beispielsweise zur Untersuchung der Phototoxizität, also der schädigenden Wirkung von



- 16 -

Licht unterschiedlicher Wellenlänge, auf Zellstrukturen. Das erfindungsgemäß hergestellte Hautäquivalent kann selbstverständlich auch zur Untersuchung der Wundheilung eingesetzt werden.

- 5 Die Wirkungen von Substanzen oder Agenzien auf menschliche Haut lassen sich beispielsweise anhand der Freisetzung von Stoffen, beispielsweise Cytokinen oder Mediatoren, durch Zellen des humanen Hautmodellsystems, sowie der Wirkungen auf Genexpression, Stoffwechsel, Proliferation, Differenzierung  
10 und Reorganisation dieser Zellen ermitteln. Unter Verwendung von Verfahren zur Quantifizierung der Zellschädigung, insbesondere unter Verwendung eines Vitalfarbstoffes, wie eines Tetrazoliumderivates,  
15 können beispielsweise cytotoxische Wirkungen auf Hautzellen nachgewiesen werden. Die Tests von Substanzen oder Agenzien an dem erfindungsgemäßen humanen Hautäquivalent können sowohl histologische Verfahren als auch immunologische und/oder molekularbiologische Verfahren umfassen.  
20

- Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung umfasst daher Verfahren zur Untersuchung der Wirkung, insbesondere der pharmakologischen Wirkungen, von Substanzen oder Agenzien auf menschliche Haut unter  
25 Verwendung des erfindungsgemäß hergestellten humanen Hautäquivalentes. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird dabei ein EZ4U-Test durchgeführt. EZ4U ist ein nicht-toxisches wasserlösliches gelbes Tetrazoliumsalz, das von lebenden Zellen  
30 zu intensiv gefärbten Formazanen reduziert werden kann. Die Reduktion erfordert intakte Mito-

- 17 -

chondrien und der Test kann daher zum Nachweis der Vitalität von Zellen eingesetzt werden.

5 Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung umfasst ein Verfahren zur Untersuchung der Penetration von Substanzen, wobei sowohl ein erfindungsgemäß hergestelltes Dermisäquivalent als auch ein erfindungsgemäß hergestelltes Hautäquivalent mit den zu untersuchenden Substanzen behandelt werden und die bei beiden Systemen erhaltenen Ergebnisse miteinander verglichen werden.

15 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die Wirkungen chemischer Substanzen oder anderer Agenzien auf spezielle Hauttypen untersucht. Dabei werden Zellen definierter Hauttypen, beispielsweise Hauttypen mit wenig Pigmenten und/oder Hauttypen mit vielen Pigmenten, zur Etablierung erfindungsgemäßer Hautäquivalente eingesetzt und diese werden im Hinblick auf die Wirkung von Substanzen oder Agenzien getestet.

20 In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird das erfindungsgemäß hergestellte Hautäquivalent als Modellsystem zu Untersuchungen von Hautkrankheiten und zur Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten für Hautleiden verwendet. Beispielsweise können Zelllinien von Patienten mit einer bestimmten Hautkrankheit verwendet werden, um daraus patientenspezifische Hautmodellsysteme zu etablieren und daran die Wirksamkeit bestimmter Therapien und/oder Medikamente zu untersuchen und zu beurteilen.

- Die Erfindung betrifft auch eine, vorzugsweise ge-  
lartige, Biomatrix, in der die vorgenannten Kulti-  
vierungsverfahren durchgeführt werden können, und  
zwar eine Biomatrix mit dermalen Fibroblasten. Die
- 5 erfindungsgemäß vorgesehene Kombination aus Biomat-  
rix und darin kultivierten dermalen Fibroblasten  
kann, wie vorstehend beschrieben, zur Herstellung  
eines Dermisäquivalentes und/oder eines organoiden  
Vollhautmodells verwendet werden.
- 10 Unter einer Biomatrix wird eine Gelstruktur ver-  
standen, die Kollagen, Zellkulturmedium, Serum und  
Puffer, beispielsweise Hepes-Puffer, enthält. Die  
Kollagenlösung, die für die Herstellung der Biomat-  
rix verwendet wird, ist eine Lösung, die einen ho-
- 15 hen Anteil an nicht denaturiertem, nativem Kollagen  
in saurem, wässrigem Medium enthält, vorzugsweise  
mit einem pH-Wert von 3,8, beispielsweise in Essig-  
säure, bevorzugt in 0,1 %iger Essigsäurelösung. Ein  
hoher Anteil von nicht denaturiertem Kollagen be-
- 20 deutet einen Anteil am Gesamtkollagen in Lösung von  
≥ 50%, insbesondere ≥ 60%, ≥ 70%, ≥ 80%, ≥ 90% oder  
≥ 95 %, vorzugsweise ≥ 99%. In einer bevorzugten  
Ausführungsform wird dabei kein lyophilisiertes  
Kollagen verwendet. Der Kollagengehalt der Lösung
- 25 beträgt vorteilhafterweise 3 mg Kollagen pro ml Lö-  
sung bis 8 mg Kollagen pro ml Lösung, bevorzugter 5  
mg Kollagen pro ml Lösung bis 7 mg Kollagen pro ml  
Lösung, am bevorzugtesten 6 mg Kollagen pro ml Lö-  
sung. Vorzugsweise wird dabei Kollagen verwendet,
- 30 das nach Isolierung, beispielsweise aus Ratten-  
schwänzen, in 0,1 %iger Essigsäure drei bis vier-  
zehn Tage bei 4°C unter Rühren inkubiert wurde und  
wobei nicht gelöste Kollagenanteile abzentrifugiert

wurden. Bevorzugte Zellkulturmedien sind DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) und M199. Jedoch kann auch jedes andere beliebige Zellkulturmedium verwendet werden, welches die Kultivierung von

5 Fibroblasten ermöglicht. Als Serum wird vorzugsweise fötales Kälberserum (FCS) verwendet und als Puffer zum Beispiel Hepes-Puffer. Der pH-Wert der Lösung aus Zellkulturmedium, Puffer und Serum beträgt in bevorzugter Ausführung 7,5 bis 8,5, beispielsweise

10 7,6 bis 8,2, insbesondere 7,8. Selbstverständlich kann die Biomatrix weitere Faktoren, beispielsweise Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmittel, Antibiotika, Selektionsmittel und ähnliche enthalten.

Die Erfindung betrifft daher auch Verfahren zur

15 Herstellung einer dermale Fibroblasten enthaltenden Biomatrix, wobei in einem ersten Schritt frisches Kollagen menschlichen oder tierischen Ursprungs, beispielsweise aus Rattenschwänzen, hergestellt wird, indem aus kollagenhaltigem Gewebe isolierte

20 Kollagenfasern in Pufferlösung gesammelt, in Alkohol oberflächlich desinfiziert und anschließend in Pufferlösung gewaschen und anschließend in eine saure Lösung eines pH-Wertes von 0,1 bis 6,9, vorzugsweise 2,0 bis 5,0, besonders bevorzugt 3,0 bis

25 4,0, insbesondere 3,3, zum Beispiel eine 0,1 %ige Essigsäurelösung, überführt werden. Anschließend wird in einem weiteren Schritt das in der Lösung befindliche Kollagen bei 2 bis 10°C, insbesondere 4°C, für einige Tage, zum Beispiel 3 bis 14 Tage,

30 gerührt, die nicht gelösten Kollagenanteile werden abzentrifugiert und eine Kollagenlösung mit einem Kollagengehalt von 3 mg/ml bis 8 mg/ml bei 2 bis 10°C, zum Beispiel 4°C, aufbewahrt. Selbstverständ-

lich ist es möglich, die Lösung in gefrorenem Zustand zwischenzulagern, zum Beispiel bei  $-10^{\circ}\text{C}$  bis  $-80^{\circ}\text{C}$ , insbesondere  $-20^{\circ}\text{C}$ . Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Fibroblasten-haltigen Biomatrix wird in einem dritten Schritt die Lösung aus, vorzugsweise fünffach konzentriertem, Zellkulturmedium, Serum und Puffer mit vorkultivierten und abzentrifugierten Fibroblasten gemischt, wobei vorzugsweise  $1 \times 10^5$  bis  $2 \times 10^5$  Zellen pro ml, bevorzugt  $1,5 \times 10^5$  Zellen pro ml, verwendet werden. Diese Lösung beziehungsweise Suspension eines pH-Wertes von 7,5 bis 8,5, bevorzugt 7,6 bis 8,2, insbesondere 7,8, wird anschließend, besonders bevorzugt im Verhältnis 1:2, mit der vorgenannten Kollagenlösung bei 2 bis  $10^{\circ}\text{C}$ , insbesondere  $4^{\circ}\text{C}$ , gemischt. Anschließend wird die Gellösung in Kulturgefäße pipettiert und nach Gelieren bei  $37^{\circ}\text{C}$  mit Medium überschichtet. Sodann wird die Biomatrix mindestens 2 Tage kultiviert und anschließend können Keratinocyten darauf ausgebracht werden.

Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus der Beschreibung.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Figuren und Beispiele näher erläutert.

25 Figur 1 zeigt einen Längsschnitt nativer menschlicher Haut und einen Längsschnitt eines erfindungsgemäß hergestellten humanen Hautäquivalents.

Figur 2 stellt ein Säulendiagramm dar, das die prozentuale Veränderung des Zellmetabolismus von Haut-

äquivalenten zeigt, die im EZ4U-Test 48 Stunden mit zu testenden Substanzen inkubiert wurden.

Figur 3 stellt in grafischer Form die Veränderung des Interleukin 1  $\alpha$ -Gehaltes in den Medienüberständen von Hautäquivalenten dar, die 24 Stunden (24h-1) und 48 Stunden (24h-2) mit unterschiedlichen SDS-Konzentrationen inkubiert worden waren.

Figur 4 zeigt die Veränderung des Interleukin 1  $\alpha$ -Gehaltes in den Medienüberständen von Hautäquivalenten, die 24 Stunden (24h-1) und 48 Stunden (24h-2) mit zu testenden Substanzen inkubiert worden waren.

Figur 5 zeigt die Veränderung des PGE<sub>2</sub>-Gehaltes in den Medienüberständen von Hautäquivalenten dar, die 24 Stunden (24h-1) und 48 Stunden (24h-2) mit unterschiedlichen SDS-Konzentrationen inkubiert worden waren.

Figur 6 zeigt in grafischer Form die Veränderung des PGE<sub>2</sub>-Gehaltes in den Medienüberständen von Hautäquivalenten, die 24 Stunden (24h-1) und 48 Stunden (24h-2) mit zu testenden Substanzen inkubiert worden waren.

- 22 -

Beispiel 1:

**Herstellung eines dreidimensionalen humanen Haut-  
äquivalents**

Herstellung einer Gellösung

- 5 20 Teile fünffach konzentriertes M 199-Zellkultur-  
medium (Life Technologies), 10 Teile HEPES-Puffer  
(4,76 g in 100 ml PBS-Lösung, pH-Wert 7,3) und 1  
Teil Chondroitin-(4,6)-sulfat (5 mg/ml in PBS) wer-  
den gemischt und der pH-Wert des Gemisches wird auf  
10 7,8 eingestellt. Das Gemisch wird sterilfiltriert  
und anschließend mit 10 Teilen fötalem Kälberserum  
versetzt.

Herstellung einer Kollagenlösung

- 15 Zur Herstellung einer Kollagenlösung wird kollagen-  
haltiges Gewebe, wie zum Beispiel Sehnen aus Rat-  
tenschwänzen, verwendet. Alle Arbeiten werden unter  
sterilen Bedingungen mit sterilen Materialien  
durchgeführt. Die Rattenschwänze werden nach Lage-  
20 rung bei -20°C mit 70%-igem Alkohol oberflächlich  
desinfiziert. Die Haut der Rattenschwänze wird ab-  
gezogen und die einzelnen Kollagenfasern werden he-  
rausgezogen. Bei Verwendung anderer Ausgangsgewebe  
können gegebenenfalls vorhandene Zellen schonend  
25 durch mechanische, enzymatische oder chemische Be-  
handlung entfernt werden. Die Kollagenfasern werden  
in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) (pH  
7,2) gesammelt, in 70%-igem Alkohol 10 min ober-  
flächlich desinfiziert und anschließend gründlich

mit PBS gewaschen. Das Gewicht der Fasern wird bestimmt und die Fasern werden in eine 0,1%-ige essigsäurelösung überführt (Endkonzentration etwa 8 bis 12 mg/ml). Dieser Ansatz wird etwa 3 bis 14 Tage bei 4°C gerührt und anschließend werden die nicht gelösten Kollagenteile mittels Zentrifugation (1000 Upm, 1 Stund, 8°C) entfernt. Dadurch liegt das Kollagen in Lösung und nicht in faser-, Gerüst- oder Matrixform vor.

10 Herstellung der dermale Fibroblasten enthaltenden Kollagengele (Ansatz für 24 Inserts)

16 ml Kollagenlösung werden in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben und auf Eis gestellt. Vorkultivierte dermale Fibroblasten werden geernet und ausgezählt. 1,2 x 10<sup>6</sup> Fibroblasten werden in 8 ml eiskalte Gellösung aufgenommen, gut suspendiert und luftblasenfrei in die Kollagenlösung gegeben. Kollagenlösung, Gellösung und Fibroblasten werden gut gemischt. Jeweils 600 µl des Gemisches werden vorsichtig in die Vertiefung einer Mikrotiterplatte mit 24 Vertiefungen (Durchmesser je Vertiefung 10 mm) gegossen. Durch eine zweiminütige Inkubation bei 37°C erfolgt eine Gelierung des Gemisches. Nach dem Gelieren des Gemisches werden jeweils 50 µl Fibronectin (5 µg/ml) auf jedes Insert gegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 37°C beziehungsweise einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird pro Vertiefung 1 ml M199-Medium zugegeben, wobei die Inserts mit dem Medium überschichtet werden. Die im Gel enthaltenen Fibroblasten werden etwa 1 bis 2 Tage dieser Submers-Kultivierung bei 37°C unterworfen, wobei je-



- 24 -

weils nach 12 Stunden das Medium gegen frisches Medium ausgetauscht wird.

Aussaat der Keratinocyten und Kultivierung der Hautäquivalente

- 5 Vor der Aussaat der Keratinocyten wird zunächst vorsichtig das Medium in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte und von den Gelen abgesaugt. Dann werden pro Vertiefung 500 µl KBM-Medium (Clonetics), enthaltend 5% FCS. Die Gele werden mit je-
- 10 weils 50 µl Fibronectin-Lösung beschichtet und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Dann werden pro Gel 100.000 Keratinocyten in 50-100 µl KBM-Medium, enthaltend 5% FCS, ausgesät und 1 bis 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 500 µl KBM-
- 15 Medium, enthaltend 5% FCS, 8 mM CaCl<sub>2</sub>, hEGF (0,1 µg/500 ml Medium) und BPE (15 mg/500 ml Medium), zugegeben und die Gele werden 1 bis 3 Tage einer Submers-Kultivierung unterworfen, wobei das Medium täglich gegen frisches Medium ausgetauscht wird.
- 20 Danach werden die Gele weitere 2 bis 3 Tage in jeweils 1 bis 1,5 ml KBM-Medium, enthaltend 2% FCS, 8 mM CaCl<sub>2</sub>, hEGF und BPE einer Submers-Kultivierung unterworfen. Danach werden die Gele mit dem sich entwickelnden Hautäquivalent einer Airlift-
- 25 Kultivierung unterworfen. Dazu werden die Gele in eine Platte mit 6 Vertiefungen umgesetzt und pro Vertiefung werden 1,5 bis 2 ml KBM-Medium mit einem CaCl<sub>2</sub>-Gehalt von 1,88 mM ohne hEGF und BPE zugegeben, wobei der Spiegel des Mediums genau auf die
- 30 Höhe des Gels abgestimmt wird, während die Keratinocyten oder die durch Keratinocyten gebildeten Schichten nicht vom Medium bedeckt werden. Die Air-

lift-Kultivierung wird mindestens 12 bis 14 Tge fortgeführt.

Die Figur 1 stellt vergleichend native menschliche Haut und ein erfindungsgemäßes humanes Hautäquivalent dar.

Beispiel 2:

**Test chemischer Substanzen an einem dreidimensionalen humanen Hautäquivalent**

10 Substanzproben wurden zur Testung am humanen Hautäquivalent eingesetzt. Eine möglicherweise irritative Wirkung der Proben auf das Vollhautmodell sollte nach 48 Stunden Inkubationszeit über den EZ4U-Metabolismus geprüft werden. Die Sekretion von  
15  $IL1\alpha$  und  $PGE_2$  sollte in den Medienüberständen nach 24 Stunden und nach 48 Stunden mittels ELISA ermittelt werden. Als Referenzsubstanz wurden unterschiedliche Konzentrationen von SDS mitgeführt. Zum Abschluss wurden alle getesteten Hautäquivalente  
20 fixiert und der morphologische Aufbau an gefärbten Paraffinschnitten geprüft und ausgewertet.

Bei dem als Referenzsubstanz verwendeten SDS wurden die Expositionszeit ( $Et_{50}$ ) von 1 %igem SDS und die  $Ec_{50}$ -Konzentrationen über 24 Stunden beziehungsweise  
25 48 Stunden Inkubationszeit ermittelt.

Die Hautäquivalente wurden je in einem 6-well mit 1 ml Medium angesetzt (KGM ohne hEGF ohne BPE, und mit 1,8 mM  $CaCl_2$ ). Die Inkubation der Proben auf

der Oberfläche der entsprechenden Hautmodelle erfolgte nach folgendem Schema:

Tag 1: Aufbringen von 3 µl Substanz morgens und nachmittags.

- 5 Tag 2: Medienwechsel und Einfrieren der Medienüberstände für die  $\text{IL1}\alpha$ - und  $\text{PGE}_2$ -Bestimmung. Behandlung mit 3 µl Substanz morgens und nachmittags.

- 10 Tag 3: Einfrieren der Medienüberstände für die  $\text{IL1}\alpha$ - und  $\text{PGE}_2$ -Bestimmung. Ermittlung des Zellmetabolismus im EZ4U-Test über einen Zeitraum von 2 Stunden. Fixierung der Präparate und Anfertigung von gefärbten Paraffinschnitten für die histologische Auswertung.

- 15 Die mitgeführten Negativkontrollen wurden entsprechend mit 3 µl PBS behandelt. Als Referenzsubstanz beziehungsweise Positivkontrolle wurde SDS in unterschiedlichen Konzentrationen (0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%) verwendet. Von allen Proben wurden Doppelwerte angesetzt.

- 20 Der EZ4U-Test wurde wie folgt durchgeführt: Nach 48-stündiger Inkubation wurde der Zellmetabolismus der einzelnen Hautäquivalente anhand eines Vitalfarbstoffes (Tetrazoliumderivat) photometrisch ermittelt. Alle Äquivalente wurden vor der Durchführung es EZ4U-Tests dreimal vorsichtig mit 1,5 ml PBS gewaschen. Eine Umsatzkinetik der Negativkontrollen, Positivkontrollen und der mit den Proben behandelten Äquivalente wurde bei 450 nm (mit 620 nm als Referenzwellenlänge) über einen Zeitraum von
- 25
- 30 2 Stunden erstellt. Hierfür wurden, wie bereits be-

schrieben, 750 ml Assay-Medium und 75 µl Farbstoff pro Insert bei 37°C inkubiert. Für SDS wurde sowohl die Ec50 als auch die Et50 bestimmt. Die Ermittlung der Et50 erfolgte nach unterschiedlichen Expositionszeiten von 1% SDS (3 sec, 30 sec, 60 sec, 5 min, 15 min).

Der Gehalt an  $IL1\alpha$  und  $PGE_2$  in den Medienüberständen nach 24 Stunden und 48 Stunden Inkubation der Proben wurde anhand kommerziell erhältlicher ELISA Testkits nach Vorschrift bestimmt.

Die Hautäquivalente wurden histologisch untersucht, wobei die Präparate in Bouin's Solution fixiert und in Paraffin eingebettet, histologische Schnitte angefertigt und gefärbt wurden.

Die Ermittlung des Zellmetabolismus von Negativkontrolle, Referenz beziehungsweise Positivkontrolle und der Probenäquivalente erfolgte über die Berechnung der Absorptionsdifferenz ( $\Delta OD$ ). Die Veränderung der  $\Delta OD$  durch den Referenzstandard in unterschiedlichen Konzentrationen und durch 48-stündige Inkubation der Proben wurde bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (Negativkontrolle, 100%) in Prozent umgerechnet.

Aus den ermittelten Werten wurde für SDS eine Dosis-Wirkungskurve beziehungsweise eine Zeit-Wirkungskurve erstellt und die Expositionszeit (Et50) beziehungsweise Konzentration (Ec50) ermittelt, die eine 50%ige Zellschädigung hervorruft. Da die Proben lediglich unverdünnt und alle über einen Zeitraum von 48 Stunden inkubiert wurden, wurde die

- 28 -

jeweils ermittelte  $\Delta OD$  prozentual zur Kontrolle dargestellt.

### Ergebnisse

#### 5 a) Cytotoxizität der Proben

Der Zellmetabolismus der Proben wurde nach 48 Stunden Inkubation photometrisch bestimmt. Anhand der EZ4U-Umsatzkinetiken wurde die jeweilige Veränderung des Zellmetabolismus ermittelt, prozentual zur unbehandelten Kontrolle berechnet und mit der mitgeführten Referenzsubstanz verglichen. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse dieses Testes dargestellt. Figur 2 zeigt die Veränderungen des Zellmetabolismus von Hautäquivalenten nach 48-stündiger Inkubation von Hautäquivalenten mit unterschiedlichen Konzentrationen der Referenzsubstanz SDS.

- 29 -

Proben-Nr.	AST-2000
0 (Kontrolle)	100%
SDS 0,73%	50%
186	47,6±17,3%
187	56,6±23,4%
188	45±13,8%
189	46,5±22,8%
190	67±25,6%
191	55,7±25,9%
342	39,7±13,6%
355	46,1±12,5%

5      Tabelle 1: Prozentuale Veränderung des Zellmetabolismus nach 48 Stunden Inkubation mit den Proben, relativ zur unbehandelten Kontrolle (100%)

b) Cytokinausschüttung am Beispiel von Interleukin 1a (II1a)

10      Die induzierte Sekretion des Cytokins II1a wurde nach einmal 24 Stunden und nach einer anschließenden weiteren Inkubation für 24 Stunden mit Testsubstanzen in den Medienüberständen der Äquivalente durch ELISA quantifiziert. Als Testsubstanzen wurden die Proben sowie unterschiedliche Konzentrationen von SDS verwendet.

15

- 30 -

Sekretion von  $IL1\alpha$  nach SDS Stimulation

Die Ausschüttung von  $IL1\alpha$  steigt im Haut-Modell mit zunehmender SDS-Konzentration kontinuierlich an und erreicht ein Maximum bei 1 % SDS von mehr als 100 pg/ml pro Hautäquivalent. Die Werte sind nach der zweiten Inkubation insgesamt noch erhöht.

Sekretion von  $IL1\alpha$  nach Inkubation mit den Proben

Die  $IL1\alpha$ -Ausschüttung durch die Proben war im Haut-Modell nach 24 Stunden Inkubation relativ gering (15-25 pg/ml), nach einer zweiten Inkubation von 24 Stunden konnten jedoch deutlich erhöhte  $IL1\alpha$  Werte gemessen werden.

In Figur 3 sind die mit der Referenzsubstanz SDS erhaltenen Ergebnisse gezeigt. Figur 4 zeigt die mit den getesteten Proben erhaltenen Ergebnisse.

c) Expression des Eicosanoids Prostaglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ )

Die Synthese des Entzündungsmediators  $PGE_2$  wurde bei dem Haut-Modell nach einmaliger Inkubation für 24 Stunden und nach einer anschließenden zweiten Inkubation für 24 Stunden Inkubation mit Testsubstanzen in den Medienüberständen der Äquivalente quantitativ durch ELISA ermittelt. Als Testsubstanzen wurden die Proben 186-355 sowie unterschiedliche Konzentrationen von SDS verwendet.

### Synthese von PGE<sub>2</sub> nach SDS-Stimulation

Die Synthese von PGE<sub>2</sub> bleibt im Haut-Modell bis zu einer SDS Konzentration von 0,5% nahezu unverändert gering und steigt aber bereits nach den ersten 24 Stunden bei einer Konzentration von 1% SDS steil an bis auf mehr als 4000 pg/ml pro Hautäquivalent. Die Werte sind nach der zweiten Inkubation für 24 Stunden praktisch unverändert (Figur 5).

### Synthese von PGE<sub>2</sub> nach Inkubation mit den Proben

Im Haut-Modell wurde durch die Proben eine deutliche PGE<sub>2</sub> Synthese induziert.

Figur 5 zeigt den Einfluss der Referenzsubstanz SDS auf die Synthese von PGE<sub>2</sub> in den erfindungsgemäßen Hautäquivalenten, während Figur 6 den Einfluss der getesteten Proben auf die PGE<sub>2</sub>-Synthese zeigt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das Haut-Modell sehr sensibel und differenziert auf Irritationen reagiert. So ist beispielsweise bei der Ill $\alpha$ -Ausschüttung durch SDS ein konzentrationsabhängiger Anstieg zu beobachten. Die untersuchten Proben zeigten ebenfalls eine deutlich verstärkte Ill $\alpha$ -Sekretion mit zunehmender Inkubationszeit.

Die Untersuchung der PGE<sub>2</sub>-Synthese zeigt, dass beim Haut-Modell durch Irritation eine vermehrte Ausschüttung ausgelöst wird. So steigt die PGE<sub>2</sub>-Synthese stark an. Die Werte sind vergleichbar



- 32 -

mit der Irritationsschwelle von SDS Ec50 von 0,73%. Deutliche Werte konnten auch nach Inkubation der Proben gemessen werden.

d) Histologische Veränderungen der Hautäquivalente

5        Der morphologische Aufbau aller getesteten Äqui-  
valente wurde im Anschluss an die EZ4U-Versuche  
histologisch untersucht und ausgewertet. Die  
histologischen Schnitte zeigten eine differen-  
10        zierte Schädigung in Abhängigkeit des Irritati-  
onsgrades. Die untersuchten Proben haben nach  
zweimal 24 Stunden Inkubation mit mehrmaligem  
Auftragen der Probe die Verhornung teilweise  
aufgeweicht, die proliferativen Zellschichten  
aufgelockert und mehr oder weniger geschädigt.

15

Ansprüche

- 5 1. Verfahren zur Vermehrung von dermalen Fibroblasten, wobei die dermalen Fibroblasten eingebettet in einer dreidimensionalen, gelartigen Biomatrix, enthaltend mindestens 3 mg/ml Kollagen in gepuffertem serum-haltigen Zellkulturmedium, kultiviert werden.
- 10 viert werden.
2. Verfahren zur Überprüfung der Funktion, Morphologie und/oder des Differenzierungsstatus' von dermalen Fibroblasten, wobei die zu überprüfenden dermalen Fibroblasten in eine dreidimensionale, gelartige Biomatrix, enthaltend mindestens 3 mg/ml Kollagen in gepuffertem serum-haltigen Zellkulturmedium, eingebracht, in dieser kultiviert und gleichzeitig oder danach überprüft werden.
- 15 tige Biomatrix, enthaltend mindestens 3 mg/ml Kollagen in gepuffertem serum-haltigen Zellkulturmedium, eingebracht, in dieser kultiviert und gleichzeitig oder danach überprüft werden.
3. Verfahren zur Herstellung eines in vitro-Dermisäquivalentes, wobei dermale Fibroblasten in eine dreidimensionale, gelartige Biomatrix, enthaltend mindestens 3 mg/ml Kollagen in gepuffertem serum-haltigen Zellkulturmedium, eingebettet und in dieser so kultiviert werden, dass ein in vitro-Dermisäquivalent gewonnen wird.
- 20 Dermisäquivalentes, wobei dermale Fibroblasten in eine dreidimensionale, gelartige Biomatrix, enthaltend mindestens 3 mg/ml Kollagen in gepuffertem serum-haltigen Zellkulturmedium, eingebettet und in dieser so kultiviert werden, dass ein in vitro-
- 25 Dermisäquivalent gewonnen wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die Kultivierung der dermalen Fibroblasten eine mindestens ein- bis zweitägige Submerskultur umfasst.

5. Verfahren zur Herstellung eines in vitro-Dermisäquivalentes nach Anspruch 3 oder 4, umfassend das Isolieren von kollagenhaltigem Gewebe, das Überführen des kollagenhaltigen Gewebes in saure Lösung, das Inkubieren des in die saure Lösung überführten Kollagengewebe bei 2 bis 10°C, insbesondere 4°C, das Abzentrifugieren nicht gelöster Kollagenanteile, das Mischen der erhaltenen Kollagenlösung bei 2 bis 10°C, vorzugsweise 4°C, mit einer Lösung, enthaltend die dermalen Fibroblasten, Zellkulturmedium, Serum und Puffer, und das Gelieren der gemischten Lösung durch Erhöhung der Temperatur.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 5, wobei die dermalen Fibroblasten nach Kultivierung in der dreidimensionalen, gelartigen Biomatrix aus dieser herausgelöst und in höherer Zelldichte weiter kultiviert werden, so dass ein in vitro-Dermisäquivalent gewonnen wird.

7. Verfahren zur Herstellung eines dreidimensionalen in vitro-Hautäquivalentes, wobei dermale Fibroblasten in eine dreidimensionale, gelartige Biomatrix, enthaltend mindestens 3 mg/ml Kollagen in gepuffertem serum-haltigen Zellkulturmedium, eingebettet und in dieser einer mindestens ein- bis zweitägigen Submers-Kultur unterworfen werden und wobei danach Keratinocyten in einem Zellkulturmedium auf der Biomatrix ausgesät und danach weiter kultiviert werden, so dass ein dreidimensionales in vitro-Hautäquivalent gewonnen wird.

- 35 -

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Kultivierung der Keratinocyten mindestens eine 5- bis 6-tägige Submers-Kultur und mindestens eine 12- bis 14-tägige Airlift-Kultur umfasst.
- 5 9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, wobei die Keratinocyten einen hohen Anteil undifferenzierter basaler Stammzellen aufweisen.
- 10 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, wobei vor, während oder nach der Aussaat der Keratinocyten andere Hautzelltypen, wie Melanocyten, Immunzellen und/oder Endothelzellen, auf der Biomatrix ausgesät und kultiviert werden.
- 15 11. Verfahren zur Herstellung eines dreidimensionalen in vitro-Hautäquivalentes nach einem der Ansprüche 7 bis 10, umfassend das Isolieren von kollagenhaltigem Gewebe, das Überführen des kollagenhaltigen Gewebes in saure Lösung, das Inkubieren des in die saure Lösung überführten Kollagengewebe bei 2 bis 10°C, insbesondere 4°C, das Abzentrifugieren nicht gelöster Kollagenanteile, das Mischen der erhaltenen Kollagenlösung bei 2 bis 10°C, vorzugsweise 4°C, mit einer Lösung, enthaltend die dermalen Fibroblasten, Zellkulturmedium, Serum und Puffer, das Gelieren der gemischten Lösung durch
- 20 Erhöhung der Temperatur, das Inkubieren des gelierten Gemisches bei 37°C und das Aussäen der Keratinocyten und/oder der anderen Hautzelltypen auf das inkubierte, gelierte Gemisch.
- 25 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die eingebettete dermale Fibroblasten enthal-
- 30

- 36 -

tende Biomatrix hergestellt wird, indem aus einem Gewebe isolierte Kollagenfasern in saurer Lösung 3 bis 14 Tage bei 2 bis 10°C, vorzugsweise 4°C, gerührt, nicht gelöste Kollagenanteile abzentrifugiert und die erhaltene fertige Kollagenlösung mit einem Kollagengehalt von 3 mg/ml bis 8 mg/ml mit einer Lösung, enthaltend dermale Fibroblasten, Zellkulturmedium, Serum und Puffer, bei 2 bis 10°C, vorzugsweise 4°C, gemischt und anschließend bei höherer Temperatur, vorzugsweise bei Raumtemperatur bis 37°C, geliert wird.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die saure Lösung Essigsäurelösung, insbesondere 0,1 %ige Essigsäurelösung, ist.

14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, wobei die Lösung, enthaltend Zellkulturmedium, Serum und Puffer, im 1:2-Verhältnis mit der kollagenhaltigen Lösung gemischt wird.

15. In vitro-Dermisäquivalent, hergestellt nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 bis 6 oder 12 bis 14.

16. Humanes in vitro-Dermisäquivalent gemäß Anspruch 15, hergestellt unter Verwendung humaner dermaler Fibroblasten.

17. Dreidimensionales in vitro-Hautäquivalent, hergestellt nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 7 bis 14.

18. Humanes dreidimensionales in vitro-Hautäquivalent gemäß Anspruch 17, hergestellt unter

- 37 -

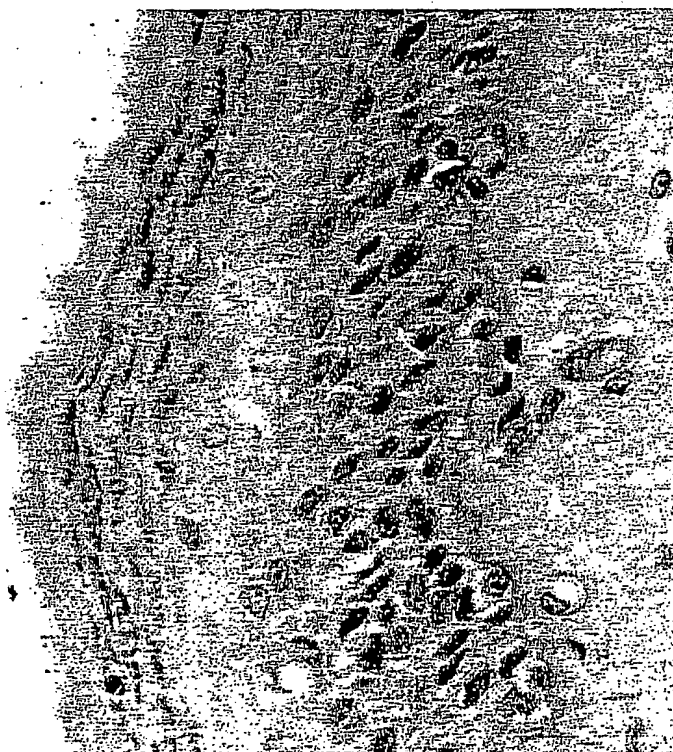
Verwendung humaner dermaler Fibroblasten und humaner Keratinocyten und gegebenenfalls anderer humaner Hautzelltypen.

19. Verfahren zur Bestimmung der Wirkung einer chemischen Substanz oder eines Agens auf Dermiszellen, umfassend das Inkontaktbringen der chemischen Substanz oder des Agens mit einem in vitro-Dermisäquivalent gemäß Anspruch 15 oder 16 und Bestimmung der Wechselwirkung zwischen Dermisäquivalent und der chemischen Substanz oder dem Agens.

20. Verfahren zur Bestimmung der Wirkung einer chemischen Substanz oder eines Agens auf Hautzellen, umfassend das Inkontaktbringen der chemischen Substanz oder des Agens mit einem dreidimensionalen in vitro-Hautäquivalent gemäß Anspruch 17 oder 18 und Bestimmung der Wechselwirkung zwischen Hautäquivalent und der chemischen Substanz oder dem Agens.

20

1/6



In vivo

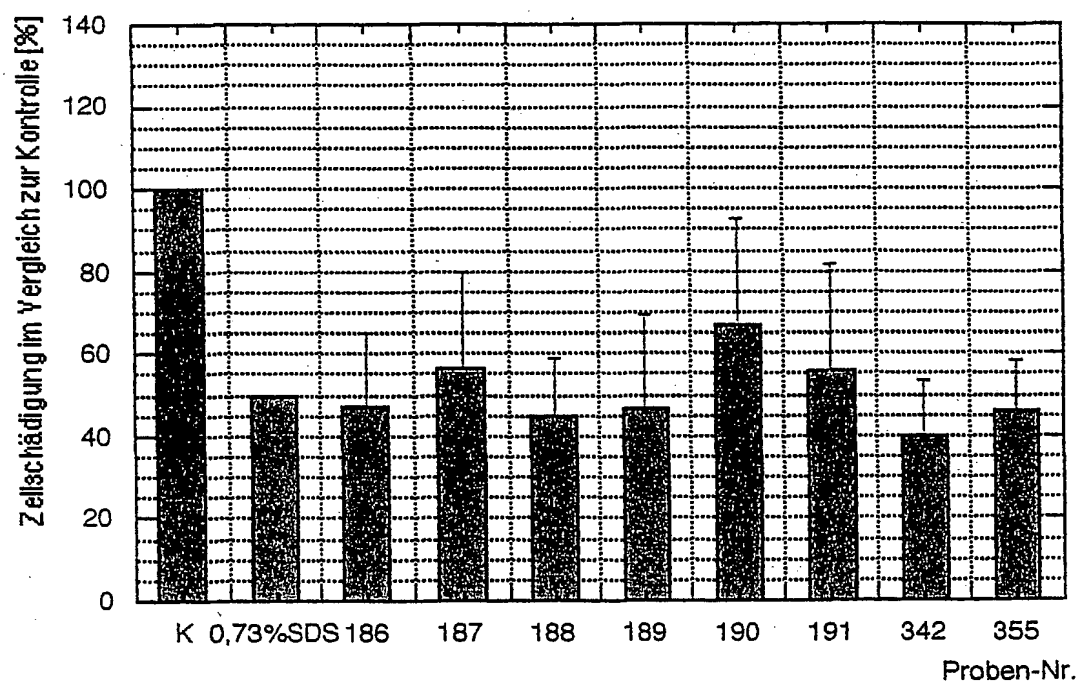


In vitro

Figur 1

BEST AVAILABLE COPY

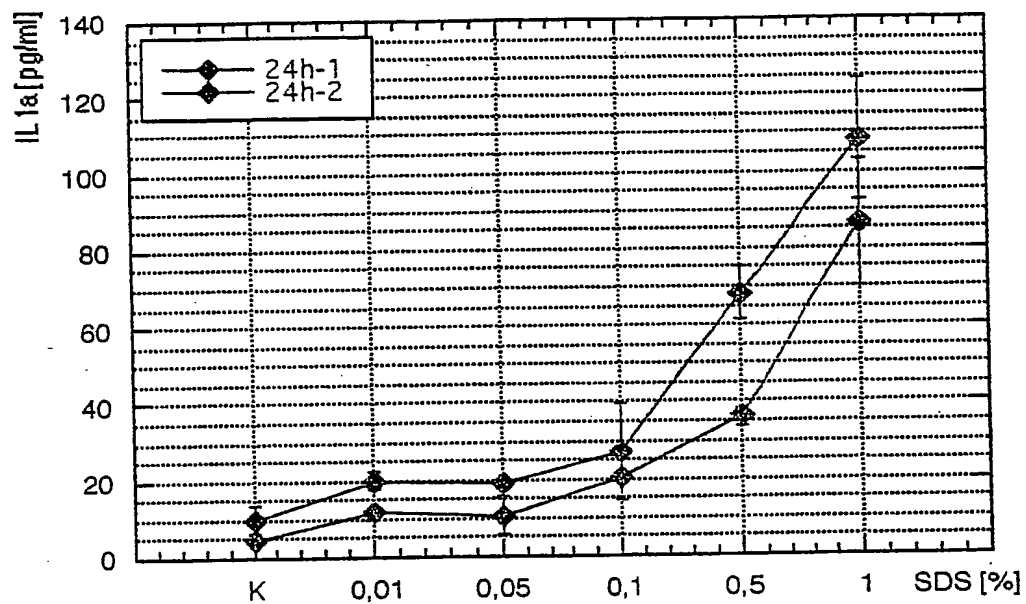
2/6



Figur 2



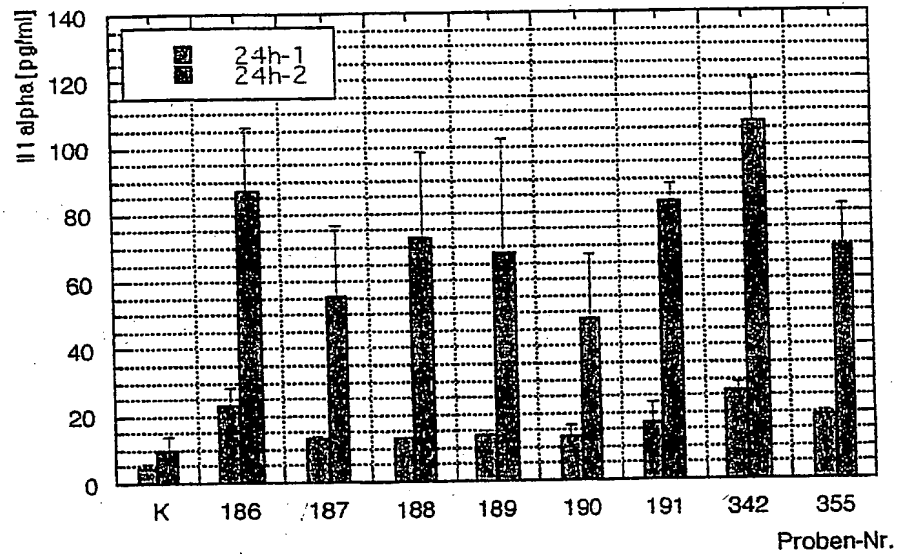
3/6



Figur 3

4/6

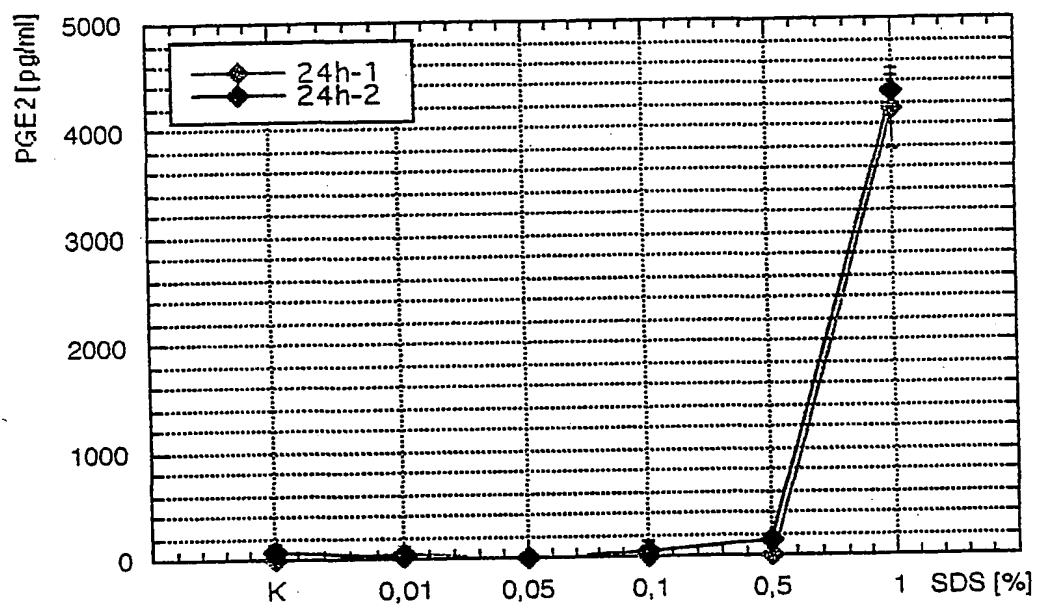
BEST AVAILABLE COPY



Figur 4

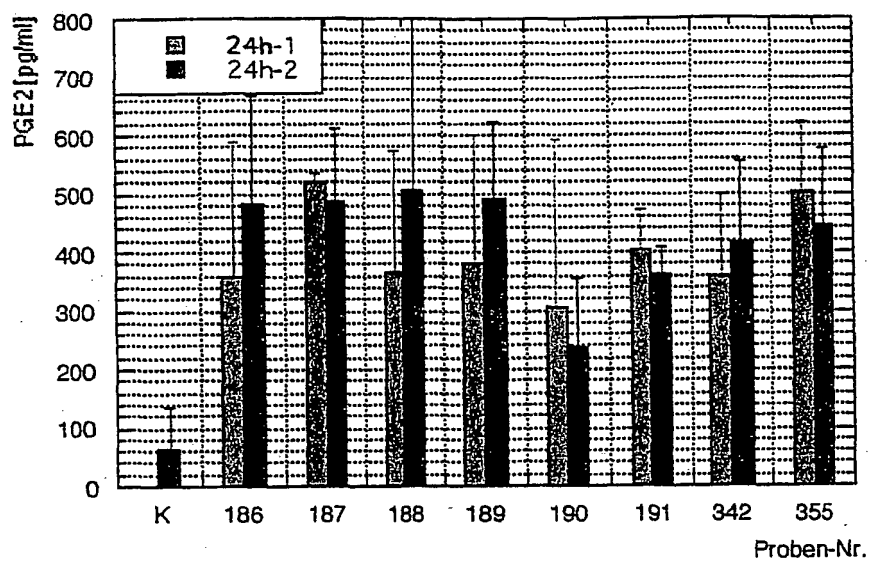
5/6

BEST AVAILABLE COPY



Figur 5

6/6



Figur 6